

UN COMPLEXE D'ACIDES AMINES DE ZINC AMELIORE LA MORPHOLOGIE DES VILLOSITES INTESTINALES CHEZ LE POULET

**De Grande Annatachja¹, Delezie Evelyn², Rapp Christof³, Van Immerseel Filip¹,
Leleu Saskia², Ducatelle Richard¹**

¹*Department of Pathology, Bacteriology and Avian Diseases, Faculty of Veterinary
Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, 9820 MERELBEKE, Belgium*

²*ILVO (Flanders Research Institute for Agriculture, Fisheries and Food), Scheldeweg
68, 9090 MELLE, Belgium*

³*Zinpro Corporation, Akkerdistel 2E, 5831 PJ BOXMEER, The Netherlands*

Annatachja.DeGrande@UGent.be

RÉSUMÉ

Le zinc joue un rôle essentiel dans des nombreux processus biologiques et agit principalement comme catalyseur d'enzymes et a des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Le zinc influence la division cellulaire et peut jouer un rôle sur la morphologie intestinale. Les sources de zinc organiques sont considérées comme plus biodisponibles que les sources inorganiques, mais les mécanismes d'amélioration ne sont pas encore très clairs. L'objectif de cette étude est de comparer les effets d'un apport de zinc, sous forme organique ou minéral, sur la croissance, la morphologie intestinale et le statut oxydatif. Il comprend deux traitements : 60 ppm de zinc étaient apportées, soit sous forme de complexe d'acides aminés de zinc (ZnAA), soit sous forme de sulfate de zinc (ZnSO₄) avec 10 cases par traitement contenant chacune 34 poulets mâles (Ross[®] 308). L'aliment est à base de blé et de seigle et se caractérise par de forte teneur en polysaccharides non amylacés hydrosolubles (PNah). Aucune enzyme PNA n'est incorporée dans l'aliment afin d'augmenter la viscosité intestinale pour induire un léger stress alimentaire chez les poulets. La morphologie intestinale est évaluée dans le duodénum en mesurant la longueur des villosités et la profondeur des cryptes sur des sections colorées à l'hématoxyline-éosine. Le degré d'inflammation intestinale et le statut oxydatif (l'activité de la glutathion peroxydase) sont également évalués. Les données sont analysées statistiquement à l'aide d'un test t pour échantillons indépendants. Le groupe recevant le ZnAA présente un indice de consommation meilleur au cours de la phase de démarrage (0-10j) par rapport aux poulets consommant le ZnSO₄ (J0-10 : 1,149 vs 1,172, P = 0,029). Une longueur de villosités supérieure est observée dans le groupe ZnAA (J10 : 1308 µm vs 1206 µm, P = 0,046 et J28 : 1667 µm vs 1489 µm, P = 0,012). Le traitement avec ZnAA entraîne une baisse de l'activité de la glutathion peroxydase plasmatique (0,60 vs. 0,72 µmol/min.ml, P = 0,021), mais aucune différence n'est détectée concernant l'inflammation intestinale. Ces résultats montrent un impact bénéfique de l'apport de zinc sous forme ZnAA sur la morphologie des villosités intestinales et un besoin moindre en enzyme antioxydant pour maintenir le statut oxydatif.

ABSTRACT

Zinc amino acid complex is improving intestinal morphology in broilers

As zinc plays an essential role in many biological processes and acts as an important catalytic component of proteins and has antioxidant and anti-inflammatory properties. As zinc has an effect on cellular proliferation it's possible that zinc effects intestinal morphology. Organic zinc sources are considered to be more bioavailable than inorganic zinc sources, but it's not clear how this impacts poultry health and performance. A trial was conducted to evaluate and compare the effect of complexed zinc or inorganic zinc source on performance, intestinal morphology and oxidative status. The trial consisted of two treatments: 60 ppm zinc were supplemented either as zinc amino acid complex (ZnAA) or as zinc sulphate (ZnSO₄) with 10 replicates (34 broilers per pen) per treatment. The diet was a wheat-rye based diet with a high level of non-starch polysaccharides without addition of NSP enzyme in order to create an intestinal challenge for the birds due to higher viscosity of the intestinal content. The intestinal health was evaluated by measuring the villus length and the crypt depth on haematoxylin-eosin stained sections. Moreover, the intestinal inflammation and the oxidative status were determined. The treatment group receiving the ZnAA had a significantly lower feed conversion ratio in the early phase compared to birds receiving ZnSO₄ (d0-10: 1.149 vs 1.172 kg/kg, P=0.029). A significantly higher villus length was observed for the ZnAA group at day 10 and at day 28. Treatment with ZnAA resulted in a lower plasma glutathione peroxidase activity (0.60 vs. 0.72 µmol/min.ml, P=0.021), but no difference for intestinal inflammation was found. These results show a beneficial impact on villus morphology and a lower need of antioxidant enzyme to maintain the oxidative status for treatment with ZnAA.

INTRODUCTION

Le zinc est un oligo-élément essentiel car il intervient dans la formation des plumes et des os, la réponse immunitaire et la synthèse de protéines et d'ADN chez les poulets de chair (Cao et al., 2002; Park et al., 2002). Afin de maintenir la santé intestinale et la productivité des poulets de chair dans un contexte de réduction de l'usage des antibiotiques dans l'alimentation, des recherches ont été menées sur un large éventail d'additifs, notamment le zinc, n'importe quelle forme (Ma et al., 2011, Shao et al. 2014). Ainsi Shao et al. (2014) indiquent que le zinc inorganique (zinc sulfate, 120 ppm) participe au maintien de la morphologie et la fonction gastro-intestinale. La supplémentation en zinc inorganique par-rapport à un groupe témoin non supplémenté montre l'augmentation de la longueur des villosités et un effet positif sur la fonction digestive et absorbative des cellules épithéliales. Il n'y a pas de données connues sur les muqueuses intestinales avec les complexes d'acides aminés de zinc. Les mécanismes par lesquels le zinc intervient sur cette fonction méritent d'être élucidés. Selon Oteiza et al. 2000 il semble important de fournir suffisamment de zinc rapidement disponible pour éviter une éventuelle subcarence. Les complexes d'acides aminés de zinc sont considérés comme plus disponibles, en raison de la présence de récepteurs d'acides aminés présents à la surface des entérocytes (Gao et al, 2014, Sauer et al., 2017). Dans ce contexte, cet essai est mené pour comparer l'effet d'un complexe d'acides aminés de zinc à du sulfate de zinc chez le poulet de chair.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux et conditions d'élevage

680 poulets de chair mâles d'un jour (Ross® 308) sont divisés de façon aléatoire en 20 groupes (10 répétitions par traitement et 34 poulets de chair par case). Les animaux seront hébergés dans des enclos au sol solide recouvert de copeaux de bois de 2,2 m² au total, mais avec une surface disponible de 1,9 m² et une densité de 17,9 animaux / m². Jusqu'au jour 7, les animaux ont été soumis à un programme d'éclairage de 23 heures avec une heure d'obscurité. À partir du septième jour, les animaux ont été soumis à un programme d'éclairage de 18 heures à la lumière et de 6 heures d'obscurité.

Les températures ont été adaptées au poids des animaux (<0.5 kg, 32°C ; >1kg, 24°C, >1,5 kg, 21°C, >2kg, 18-20°C). Tous les poulets reçoivent une ration blé-seigle à fortes teneurs en PNah sans ajout d'enzyme PNah. Les aliments contiennent 60 ppm de zinc soit sous forme de ZnSO₄ soit sous forme de complexes d'acides aminés de zinc (ZnAA). Le programme d'alimentation est en trois phases. La formule alimentaire utilisée dans cet essai est considérée comme stressante pour le

tractus digestif (Teirlynck et al. 2009), à cause de la teneur élevée en protéines brutes et en polysaccharides non amylacés. Aucune enzyme PNA n'est incorporée dans l'aliment afin d'induire un léger stress alimentaire chez les poulets pour entraîner une forte viscosité intestinale.

1.2. Mesures zootechniques et prélèvement

Aux jours 10, 28 et 36, trois oiseaux par case sont euthanasiés par une surdose intraveineuse de phénobarbital de sodium (20%), suivie d'une exsanguination. Les échantillons de sang sont prélevés dans des tubes enduits d'héparine et conservés à -20°C après centrifugation. Des sections du duodénum sont fixées dans du formaldéhyde à 4%, car il est plus facile de mesurer les longueurs de villosités et la profondeur des cryptes dans le duodénum. Les oiseaux et les aliments sont pesés par enclos pour calculer l'indice de consommation alimentaire (IC), le gain de poids et la consommation alimentaire.

1.3. Analyse histologique

La longueur des villosités et la profondeur des cryptes sont évaluées à partir de lames colorées à l'hématoxyline-éosine de coupes duodénales de trois animaux par enclos (une lame par animaux et 10 à 12 villosités mesurées par lame) et d'analyses effectuées à l'aide d'un microscope Leica DM LB2 Digital et du logiciel d'analyse d'image (LAS V4.1).

1.4. Analyse immunohistologique

La densité de cellules CD₃⁺ est déterminée au niveau de la muqueuse du duodénum et sert d'indicateur du statut inflammatoire au niveau intestinal. Pour la coloration par immunohistochimie des cellules CD₃⁺, les lames sont incubées avec un anticorps primaire contre CD₃ (Dako A0452) dilué à 1:100 dans un diluant d'anticorps Dako (S3022) et un polymère marqué HRP anti-lapin utilisé comme anticorps secondaire.

1.5. Analyse stress oxydatif

Le malondialdéhyde (MDA) et l'activité de la glutathion-péroxydase (GPX) sont mesurés dans le plasma pour évaluer le statut antioxydant comme décrit par Michiels et al. (2014). Le MDA est l'un des produits finaux de la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique, provoquée par le stress oxydatif. La détermination de la MDA est utilisée pour évaluer la peroxydation lipidique causée par le stress oxydatif. La GPX est une enzyme spécifique

du système antioxydant de la cellule (Michiels et al. 2012).

1.6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont effectuées avec SPSS Statistiques (v.23) et la comparaison des données est effectuée avec un test t dans le cas d'échantillons indépendants. Les différences sont considérées comme statistiquement significatives lorsque $P \leq 0,05$ et considérées comme une tendance lorsque $0,05 < P \leq 0,10$.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Performances zootechniques

Les performances moyennes des animaux de l'essai sont de très bons niveau par rapport à objectif de performance d'Aviagen (2014) malgré unaliment non favorable. L'IC est meilleur pendant la période de 0 - 10 jours et montre une tendance à être plus bas pendant la période de 0 - 28 jours chez les oiseaux nourris au régime ZnAA par rapport à ceux nourris au régime ZnSO₄ (tableau 1). Cela n'est pas rapporté dans les essais précédents (Liu et al., 2015, Star et al. 2015), mais différents suppléments de zinc ont été comparés à un groupe témoin non supplémenté et ne se sont pas comparé entretenus ?.

2.2. Morphologie intestinale et immunohistochimie

La supplémentation en ZnAA permet d'obtenir des villosités significativement plus longues dans les sections du duodénum, au jour 10 et au jour 28 (tableau 2). Une augmentation de la longueur des villosités est associée à une digestion et une absorption accrue des nutriments. Les cellules épithéliales migrant de la crypte des villosités à la

pointe des villosités le long de la surface des villosités. L'intégrité des villosités étant supérieure car plus longues et donc en meilleur état et peut résulter dans une expression plus élevée des enzymes de bordure en brosse et des systèmes de transport des nutriments (Awad et al., 2008). L'amélioration de la morphologie des villosités peut permettre d'expliquer l'amélioration de l'IC constatée précédemment lors de l'ajout de ZnAA (tableau 1). Cette forme d'apport de zinc peut induire une amélioration de la morphologie intestinale. L'immunohistochimie ne montre pas de différence significative de densité des cellules de CD3 selon le traitement alimentaire.

2.3 Le stress oxydatif

La supplémentation de ZnSO₄ ou ZnAA n'influence pas les niveaux de MDA dans le plasma. Par ailleurs, une supplémentation en ZnAA montre une activité plasmatique significativement plus faible pour la GPX (Tableau 3). Comme les niveaux dans la MDA ne sont pas significativement différents, le traitement par ZnAA permet un besoin moindre en enzymes antioxydants pour maintenir le même statut antioxydant.

CONCLUSION

La supplémentation en ZnAA dans les conditions d'un léger stress alimentaire entraîne une amélioration de la morphologie des villosités intestinales à la fin de la période de démarrage (jour 10) et à la fin de la période de croissance (jour 28) et du statut antioxydant chez les poulets de chair par rapport à la supplémentation en ZnSO₄. La supplémentation en complexe ZnAA améliore également l'IC des animaux dans la phase initiale (jour 0-10).

Tableau 1: Effet de la supplémentation en ZnSO₄ ou ZnAA sur les performances de croissance des oiseaux (n=10).

Période		PV (g)	GMQ (g/animal/j)	IA (g/j)	IC
0-10 jours	ZnSO ₄	284.7 ± 5.6	24.4 ± 0.5	28.6 ± 0.9	1.172 ± 0.018
	ZnAA	290.5 ± 5.8	25.0 ± 0.5	28.7 ± 0.9	1.149 ± 0.012
	P	0.063	0.061	0.860	0.029
Objectif Aviagen					0.995
10-28 jours	ZnSO ₄		71.5 ± 2.0	104.2 ± 3.2	1.456 ± 0.022
	ZnAA		72.6 ± 2.0	104.7 ± 2.8	1.441 ± 0.017
	P		0.283	0.720	0.167
28-36 jours	ZnSO ₄		106.4 ± 3.1	171.6 ± 3.9	1.613 ± 0.051
	ZnAA		107.4 ± 3.7	174.7 ± 3.9	1.627 ± 0.046
	P		0.487	0.170	0.405
0-28 jours	ZnSO ₄	1572 ± 38	54.7 ± 1.4	77.2 ± 2.2	1.411 ± 0.019
	ZnAA	1597 ± 40	55.6 ± 1.4	77.5 ± 2.0	1.394 ± 0.014
	P	0.207	0.207	0.733	0.073
Objectif Aviagen					1.405

0-36 jours	ZnSO ₄	2423 ± 43	67.3 ± 1.2	98.2 ± 2.4	1.459 ± 0.019
	ZnAA	2456 ± 46	68.2 ± 1.3	99.1 ± 2.1	1.453 ± 0.016
	P	0.188	0.187	0.405	0.375
	Objectif Aviagen				1.558

Le poids vif (PV) a été déterminé à la fin de chaque période (j10, j28 et d36). Gain moyen quotidien (GMQ), l'ingéré alimentaire (IA) et l'indice de consommation (IC) ont été déterminés aux trois périodes et sont présentés en moyenne ± écart-type)

Tableau 2: Effet de la supplémentation en ZnSO₄ et en ZnAA sur la morphologie intestinale de la muqueuse du duodénum aux jours 10 et 28 (n=10).

	ZnSO ₄	ZnAA	P
Jour 10			
Longueur des villosités (LV) (µm)	1206 ± 221	1308 ± 155	0.046
Profondeur des cryptes, (PC) (µm)	314.5 ± 76.6	301.6 ± 62.1	0.494
Rapport (LV/PC)	3.99 ± 1.05	4.52 ± 1.04	0.049
CD ₃ ⁺ (%) ^c	7.68 ± 2.51	6.32 ± 1.61	0.172
Jour 28			
Longueur des villosités (LV), (µm)	1489 ± 230	1667 ± 262	0.012
Profondeur des cryptes, (µm)	313.6 ± 62.3	311.4 ± 63.2	0.896
Rapport (LV/PC)	5.06 ± 1.13	5.8 ± 1.47	0.046
CD ₃ ⁺ (%) ^c	12.29 ± 2.82	11.54 ± 1.70	0.480

La longueur des villosités (µm), la profondeur des cryptes (µm), le rapport longueur des villosités à la profondeur des cryptes et la densité des cellules de CD₃⁺ sont montrés ainsi que la moyenne ± écart type (n = 10)

Tableau 3: Effet de la supplémentation en ZnSO₄ ou ZnAA sur les paramètres de stress oxydatif dans le plasma à l'âge d'abattage (36^e jour) (n=10)

Paramètres	ZnSO ₄	ZnAA	Valeur P
Malondialdéhyde (nmol/ml)	48.9 ± 5.3	42.5 ± 6.3	0.902
Activité glutathion peroxydase (µmol/min.ml plasma)	0.72 ± 0.04	0.60 ± 0.15	0.021

Tableaux 4: composition des regimes

	Demarrage 0-10 jours	Croissance 10-28 jours	Finition 28-36 jours
<u>Aliments (%)</u>			
Blé	49.29	55.62	59.00
Seigle	5.00	5.00	5.00
Tourteau de soja (48)	29.37	23.16	20.11
Soja	7.50	7.50	7.50
Tourteau de colza	2.00	2.00	2.00
Graisse animale	2.50	2.60	2.70
Huile de soja	1.00	1.00	1.00
Vitamine + oligo-éléments (vitamix)	1.000	1.000	1.000
CaCO ₃	0.820	0.908	0.826
Di-Ca-phosphate	0.650	0.361	0.107
NaCl	0.264	0.226	0.268
Bicarbonate de Na	0.104	0.157	0.101
L-Lys-HCl	0.160	0.175	0.154
DL-Methionine	0.256	0.208	0.167
L-threonine	0.071	0.064	0.049
Phytase	0.020	0.020	0.020
<u>Valeur nutritive calculée</u>			
Proteines brutes (%)	23.00	21.00	20.00
Graisses brutes (%)	6.43	6.41	6.46
Polysaccharides non amylacés hydrosolubles (%)	15.37	15.00	14.83
Energie métabolisable (MJ/k)*	11.013	11.318	11.508
D-Lysine (%)	1.12	1.03	0.95
D-Methionine + Cysteine (%)	0.86	0.77	0.71
D-Threonine (%)	0.75	0.67	0.62
D-Valine (%)	0.89	0.81	0.76
Ca (%)	0.85	0.80	0.70
P disponible (%)	0.40	0.35	0.31
NaCl + KCl (mEq/k)	254	226	213
Acide linoléique (18:2) (%)	2.10	2.07	2.06

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aviagen (2014). Ross[®] 308: performance objectives.

Awad W., Ghareeb K., Böhm J., 2008. Int. J. Mol. Sci. **9** (11), 2205-2216.

Cao J., Henry P.R., Davis, S.R. Cousins R.J. Miles R.D. Litell R.C., Ammerman C.B., 2002. Anim. Feed. Sci. Technol. **101**, 161-170.

Gao S., Yin T., Xu B., Ma Y., Hu M., 2014. Life Scie. **109**, 50-56.

Ma W., Niu H., Feng J., Wang Y., Feng J., 2011. Bio. Trace Elem Res. **142**, 546-556.

- Michiels J., Tagliabue M.M., Akbarian A., Ovyne A., De Smet S., 2014. Avian Biol. Res. **7** (2), 74-82.
- Oteiza P.I., Clegg M.S., Zago M.P., Keen C.L., 2000. Free Radic. Biol. Med. **28**, 1091-1099.
- Park S.Y., Birkhold S.G., Kubena L.F., Nisbet D.J., Ricke S.C., 2002. Biol. Trace Elem Res. **101**, 147-163.
- Shao Y., Zhao L., Yuan J., Yang Y., Guo Y., Zhang B., 2014. Microbiol. **52** (12), 1002-1011.
- Star L., van der Klis J.D., Rapp C., Ward T.L. (2012). Poult Sci **91** (3115-3120).
- Sauer, A. K., S. Pfaender, S. Hagmeyer, L. Tarana, A. K. Mattes, F. Briel, S. Kury, T. M. Boeckers, and A. M. Grabrucker. (2017). Biometals 30, 643-661.
- Swiatkiewicz S., Arczewska-Wlosek A., Jozefiak D. (2014). Worlds Poult Sci J **70**, (475-485).
- Teirlynck E., Bjerrum L., Eeckhaut V., Huygebaert G., Pasmans F., Haesebrouck F., Dewulf J., Ducatelle R., Van Immerseel F. (2009). Br J Nutr. 102 (10), 1453-1461.
- Väyrynen J.P., Tuomisto A., Klintrup K., Karttunen T.J., Mäkinen M.J., 2013. Br J Cancer **109**, 1839-1847.